

Тыныбаева К.М., Тулаев Ю.В.

ТОПЫРАҚТАРДЫ ДӘСТҮРЛІ ӨНДЕУДЕН РЕСУРСҮНЕМДЕУШІ ӨНДЕУГЕ КӨШКЕНДЕ ТОПЫРАҚ ПАРАМЕТРЛЕРІНІҢ ТРАНСФОРМАЦИЯСЫ

Аңдатпа

Топырақ мониторингі режимінде оңтүстіктік қара топырақтарды нөлдік өңдеудің топырақ құнарлылығына әсері зерттелді. Оңтүстіктік қара топырақтардың морфогенетикалық көрсеткіштері, физико-химиялық қасиеттері, су-физикалық қасиеттері зерттелді. Зерттеулер нәтижелері бойынша, топырақ тығыздығының нөлдік өңдеуде біршама аз болатыны, сәйкесінше ылғал қоры топырақтың жарты метрлік қабатында болатындығы анықталды. Нөлдік өңдеуді қолдану ауылшаруашылық дақылдарды өсіруде топырақта ылғал қорын жоғарылатып, энергия және еңбек шығындарының төмендеуіне жағдай жасайды.

Кілт сөздер: ресурснөмдеуші технологиялар, топырақтарды нөлдік өңдеу, топырақтарды дәстүрлі өңдеу, топырақтарды минималды өңдеу.

Tynybaeva K.M., Tulyaev Y.B.

TRANSFORMATION IN SOIL PARAMETERS SHIFT FROM TRADITIONAL TILLAGE FOR RESOURCE-SAVING TECHNOLOGIES TILLAGE

Summary

In the mode monitoring of soils studied the influence of zero tillage southern chernozem on the soil fertility. Were studied morphogenetic indicators, physico-chemical properties, water - physical properties of southern chernozems. According to studies it is revealed that the density of soils at zero tillage is much smaller and accordingly the moisture reserves in half-meter layer of soil. The use of zero tillage contributes to the increase in of moisture reserves in the soil, reducing energy and labor expenditures when growing agricultural crops.

Keywords: resource-saving technologies, zero tillage, conventional tillage, minimum tillage.

УДК:633 // 324: 578.0

Уразалиев К.Р., Даниярова А.К., Сариев Б.С.

Казахский НИИ земледелия и растениеводства

КАЛЛУСОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ПЫЛЬНИКОВ ОВСА И ЯЧМЕНЯ

Аннотация

Выявлены особенности влияния генотипа на каллусогенез и эмбриоидогенез в культуре пыльников овса и ячменя. Среди генотипов ячменя наиболее отзывчивыми оказались сорта Арна, Асем, Елик, овса – сорта Донен и Аламан. Изучение влияния ФГ на индукцию эмбриоидогенеза и каллусогенез в культуре изолированных пыльников ячменя показало, что наиболее оптимальными являются соотношение гормонов 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,4-0,6 мг/л БАП, а также 2,0 мг/л 2,4-Д без добавления БАП. Выявлено, что н-бутанол и в

большей мере, чем фикол оказывает положительное влияние на индукцию эмбриоидогенеза и каллусогенез в культуре изолированных пыльников.

Ключевые слова: гаплоидная технология, культура пыльников, ячмень, овес, культуральная среда.

Введение

Повышение эффективности сельскохозяйственных культур методами классической селекции практически выработало весь свой потенциал и для ускорения этого процесса и повышения его эффективности необходимо применять биотехнологические и молекулярно-генетические методы. Культура пыльников, культура изолированных микроспор и отдаленная гибридизация в зависимости от вида растений позволяют получить хорошие результаты. Внедрение гаплоидных технологий в селекционный процесс позволяет сократить время и удешевить получение новых сортов.

Имеются данные об исследованиях различных факторов, определяющих морфогенез в культуре пыльников и получение андрогенных растений, в том числе зависимость от генотипа, предварительной обработки, состава среды культивирования [1, 2, 3]. Применение культуры пыльников в селекции растений зависит от выхода гаплоидных растений и высокой частоты удвоения хромосом.

Овес является одним из самых трудных видов зерновых культур, где практическое применение культуры пыльников в селекции по-прежнему ограничено низкой частотой индукции эмбриоидов и регенерации растений. Имеются скудные данные о получении гаплоидных растений овса в культуре пыльников или гибридизацией с кукурузой. Так, существуют несколько публикаций о получении гаплоидов через систему: овес × кукуруза [1, 2, 4, 5, 6], гаплоиды овса получены в основном из культуры пыльников. Судя по литературным данным, если использование гаплоидных технологий овса связано с трудностями, связанными с регенерацией дигаплоидов, то для большинства других злаковых культур (пшеница, ячмень и др.) таких проблем нет.

Об успешных результатах по регенерации зеленых проростков ячменя сообщили Clapman D. [7] из культуры пыльников и позднее Као K.N. and et. al. [8] из изолированных микроспор. Несмотря на успешные протоколы получения дигаплоидов ячменя, в Казахстане эти наработки не оптимизированы для отечественных сортов и не внедрены в селекционный процесс. Поэтому исследования, посвященные данной теме, представляют большой интерес для практической селекции овса и ячменя в Казахстане.

Материал и методы исследований

Объектами исследования служили 7 генотипов ячменя – Арна, Асем, Бірлік-20, Север-1, Туран-2, Ула и Елик и 7 генотипов овса – Аламан, Донен, Жорга, Кулагер, Казахстанская-70, Кулан и Байге.

Проводили сбор донорных растений производили на стадиях ранней, средней и поздней одноядерной микроспоры. Стадии развития микроспор определяли согласно общепринятой методике временных давленных препаратов [9]. Срезанные колосья донорных растений 14 генотипов овса и ячменя подвергали холодовому стрессу путем выдерживания в холодильной установке при температуре +2 - +4° в течение 7-14 дней. Проводили наблюдения за состоянием микроспор в пыльниках на протяжении процесса выделения и после переноса в культуральную среду с помощью микроскопе Meiji Techno серии MT4000. Изолированные пыльники пшеницы и ячменя в асептических условиях переносились в пластиковые чашки Петри диаметром 30 мм (30 пыльников/чашка Петри), содержащие 5 мл жидкой питательной среды и в течение трех дней подвергли высокотемпературному шоку при 32°C в темноте. После пыльники переносили в термостат с температурой 28°C до появления новообразований.

При проведении экспериментов по культуре изолированных пыльников и микроспор

руководствовались общепринятыми методами культуры тканей и биотехнологии растений [10]. Проводили серий экспериментов по влиянию генотипа, фитогормонов и трофических факторов на индукцию эмбриоидогенеза и каллусогенез в культуре изолированных пыльников. В экспериментах по влиянию генотипа использовалась одна стандартная среда Мурасиге-Скуга [11] (MS, Sigma) с добавлением 90 г/л мальтозы и гормонов 2,4-Д 2,0 мг/л и БАП 1,0 мг/л. В качестве фитогормонов были взяты различные концентрации и соотношения 2,4-Д (0,0 мг/л; 0,5 мг/л; 1,0 мг/л; 1,5 мг/л; и 2,0 мг/л) и БАП (0,0 мг/л; 0,2 мг/л; 0,4 мг/л; 0,6 мг/л и 0,8 мг/л), всего испытано 25 вариантов сред. В качестве трофических факторов были использованы следующие концентрации мальтозы – 0,0 г/л; 45,0 г/л; 90,0 г/л; 135,0 г/л; и 180,0 г/л. В качестве дополнительных факторов на индукцию эмбриоидогенеза и каллусогенез в культуре изолированных пыльников овса и ячменя использовали 70,0 г/л фикола и 1,0 г/л н-бутанола.

Результаты исследований

Совместно с селекционерами подобран исходный материал ячменя и овса для дальнейшего использования в гаплоидной технологии: 7 генотипов ячменя – Арна, Асем, Бірлік-20, Север-1, Туран-2, Ула и Елик и 7 генотипов овса – Аламан, Донен, Жорга, Кулагер, Казахстанская-70, Кулан и Байге. Проведена оценка лабораторной всхожести в трех кратной повторности. Образцы ячменя и овса показали высокую всхожесть, которая варьировала в пределах от 79,5 % до 98,7 %. Закладка опыта по выращиванию донорных растений для андрогенной технологии пшеницы была проведена в теплице зерновых культур КазНИИЗиР. Сбор донорных растений производили на стадиях ранней, средней и поздней одноядерной микроспоры (Рисунок 1). На этой стадии микроспоры являются самыми восприимчивыми к андрогенной индукционной обработке.

Для синхронизации микроспор и спонтанного удвоения хромосом растения подвергаются холодовому стрессу. Все срезанные донорные растения 14 генотипов овса и ячменя были выдержаны в холодильной установке при температуре +2 - +4° в течение 7-14 дней. Микроскопическое исследование стадии развития микроспор в пыльниках показало, что в пыльниках микроспоры на оптимальной фазе развития – ранней или средней одноядерной стадии.

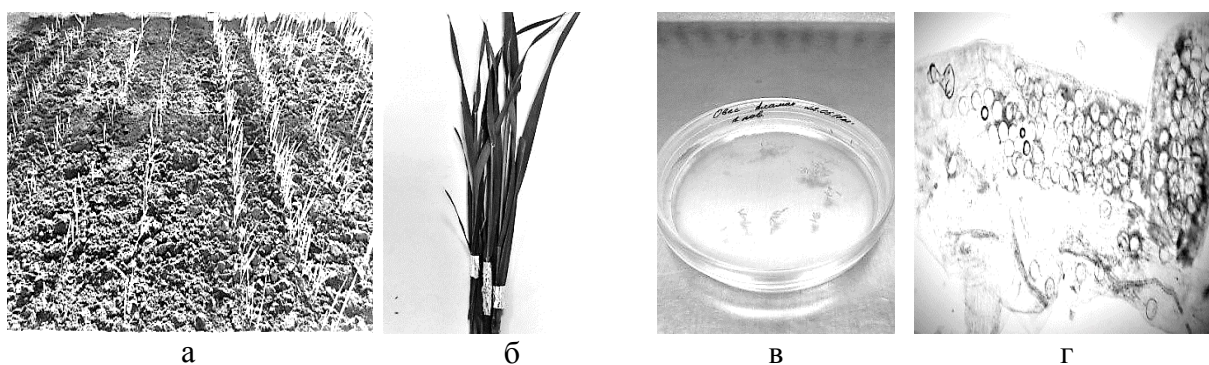


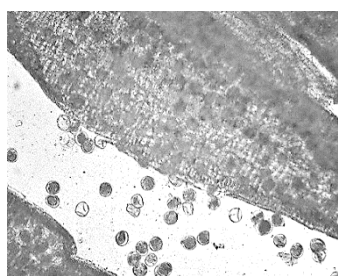
Рисунок 1 – Посев и всходы ячменя и овса (а), отбор незрелых колосьев для холодовой предобработки (б), посадка на индукционные среды тепличного материала (в), растрескивание стенок пыльников на индукционной среде (г).

Отработаны условия стерилизаций эксплантов, колосья пшеницы, прошедшие холодовую обработку в течении 1-2 недель, подвергли процессу стерилизации. Колосья растений по 5-6 колосьев (всего 400 колосьев овса и ячменя) стерилизовали сначала в 300 мл 20% раствор NaOCl с каплей Твин-80 в течение 10 минут на шейкере, а затем трижды промывали стерильной дистиллированной водой в ламинарном боксе, по 3 минуты.

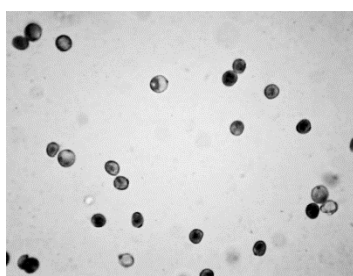
Пыльники из материалов были изолированы и культивированы на 25 вариантах стерильных питательных средах. Пыльники пшеницы в асептических условиях переносились в пластиковые чашки Петри диаметром 30 мм (30 пыльников/чашка Петри), содержащие 5 мл среды. В течение трех дней пыльники подверглись высокотемпературному шоку при 32°C в темноте. После обработки высокой температурой пыльники переносились в термостат с температурой 28°C до появления новообразований.

Культивирование пыльников проводилось по известному протоколу [12] с дополнительными модификациями. Цитологические наблюдения на протяжении процесса культивирования пыльников в жидкой питательной среде показали, что в течение 1-2 недели микроспоры проходили через серию митотических делений и формировали каллусы и проэмбрио. После 2 недели культивирования наблюдались первые каллусы, полученные из изолированных пыльников. Наблюдалось и формирование эмбриоподобных структур (Рисунок 2). Получены микрофотографии микроспор.

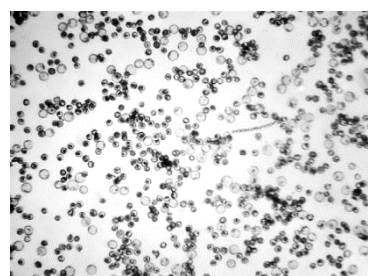
Результаты наблюдений показали, что выход микроспор из пыльцевого мешка в питательную среду протекал очень быстро и происходил почти полностью. Цитологические наблюдения за состоянием микроспор показали высокий процент жизнеспособности микроспор. Проведен ряд экспериментов по влиянию генотипа, фитогормонов и трофических факторов на индукцию эмбриоидогенеза и каллусогенез в культуре изолированных пыльников. На первом этапе исследования изучали влияние генотипа на эмбриоидогенез и каллусогенез в культуре изолированных пыльников. В этой серии экспериментов использовали 7 сортов овса (Аламан, Донен, Жорга, Кулагер, Казахстанская-70, Кулан и Байге) и 7 сортов ячменя (Арна, Асем, Бірлік-20, Север-1, Туран-2, Ула и Елик). Все исследования проводились на стандартной среде Мурасиге-Скуга (MS, Sigma) с добавлением 90 г/л мальтозы и гормонов 2,4-Д 2,0 мг/л и БАП 1,0 мг/л. Всего посажено 6750 пыльников овса и 7200 пыльников ячменя. Выяснены особенности влияния генотипа на каллусогенез и эмбриоидогенез в культуре изолированных пыльников овса и ячменя. В результате выявлено, что среди генотипов ячменя наиболее отзывчивыми оказались сорта Арна, Асем, Елик, а среди генотипов овса – сорта Донен и Аламан. В последующих экспериментах по изучению влияния ФГ на индукцию эмбриоидогенеза и каллусогенез в культуре изолированных пыльников использовали именно отзывчивые генотипы: сорта Жорга у овса и Арна у ячменя.



а



б



в



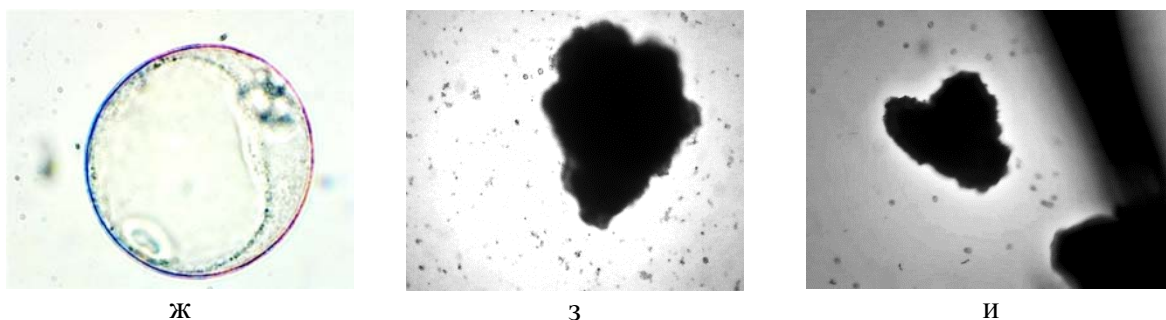
г



д



е



Обозначения: (а) – Пыльники и выход микроспор в питательную среду, (б) – эмбриогенные и нежизнеспособные микроспоры, (в-е) – Микроспоры на разных стадиях развития (средняя и поздняя одноядерная), ж – двух ядерная стадия развития, (з-и) – каллусогенез и эмбриоидогенез.

Рисунок 2 – Пыльники и микроспоры ячменя

В последующих экспериментах по изучению влияния ФГ на индукцию эмбриоидогенеза и каллусогенез в культуре изолированных пыльников использовали именно отзывчивые генотипы: сорта Жорга у овса и Арна у ячменя. Для изучения влияния фитогормонов на индукцию эмбриоидогенеза и каллусогенез в культуре изолированных пыльников испытано 25 вариантов среды, включающих различные концентрации и соотношения фитогормонов: 5 концентраций фитогормона 2,4-Д (0,0 мг/л; 0,5 мг/л; 1,0 мг/л; 1,5 мг/л; и 2,0 мг/л) и 5 концентраций фитогормона БАП (0,0 мг/л; 0,2 мг/л; 0,4 мг/л; 0,6 мг/л и 0,8 мг/л). Посажено по 2 250 пыльников овса и ячменя. Показано, что наиболее оптимальными для индукции эмбриоидогенеза и каллусогенеза ячменя является соотношение гормонов 1 мг/л 2,4-Д и 0,4-0,6 мг/л БАП, а также концентрация 2,4-Д 2,0 мг/л, взятая в отдельности, без добавления БАП.

Для изучения влияния трофических факторов на индукцию эмбриоидогенеза и каллусогенез в культуре изолированных пыльников также был проведен ряд экспериментов. Были использованы следующие концентрации мальтозы – 0,0 г/л; 45,0 г/л; 90,0 г/л; 135,0 г/л; и 180,0 г/л, соответственно. Были взяты сорта Жорга у овса и Арна у ячменя. Посажено по 450 пыльников овса и ячменя. Однако, существенного влияния трофических факторов на индукцию эмбриоидогенеза и каллусогенеза в культуре изолированных пыльников овса и ячменя не выявлено.

Также были проведены исследования по изучению влияния дополнительных факторов на индукцию эмбриоидогенеза и каллусогенез в культуре изолированных пыльников овса и ячменя (фикол и н-бутанол), которые по литературным данным оказывают влияние на данные процессы. Выявлено, что н-бутанол и в большей мере фикол оказывают положительное влияние на индукцию эмбриоидогенеза и каллусогенез в культуре изолированных пыльников, что подтверждает литературные данные.

Все исследования были проведены в 3-х повторностях по 30 пыльников в среднем в каждую чашку Петри. В экспериментах по изучению влияния генотипа всего посажено 6750 пыльников овса и 7200 пыльников ячменя. В экспериментах по изучению влияния фитогормонов были посажены по 2 250 пыльников сорта овса Жорга и ячменя Арна. В опытах по изучению влияния трофических факторов были посажены по 450 пыльников сорта овса Жорга и сорта ячменя Арна. В общей сложности на разные эксперименты по изучению влияния генотипа, фитогормонов и трофических факторов высажены пыльники – 9 450 пыльников овса и 9 900 пыльников ячменя. Всего посажено 19 350 пыльников. В целом, все запланированные ожидаемые результаты полностью достигнуты. Получена культура изолированных пыльников овса и ячменя (Рисунок 3).



Рисунок 3 – (а) – Индукция эмбриоидов и каллусов из пыльников ячменя;
(б) – каллусные ткани, полученные из эмбриоидов культуры пыльников ячменя.

Оценка индукции каллусогенеза 14 сортов овса и ячменя показала, что выход эмбриоподобных структур варьировал на разных питательных средах от 0 до 50 каллусов на 100 пыльников, наиболее высокий выход отмечен у сорта ячменя Асем и овса Донен.

Таким образом, выявлены особенности влияния генотипа на каллусогенез и эмбриоидогенез в культуре пыльников овса и ячменя. Среди генотипов ячменя наиболее отзывчивыми оказались сорта Арна, Асем, Елик, а среди генотипов овса – сорта Донен и Аламан. В последующих экспериментах эти отзывчивые генотипы использованы для изучения влияния ФГ на индукцию эмбриоидогенеза и каллусогенез в культуре изолированных пыльников. В результате показано, что наиболее оптимальными для индукции эмбриоидогенеза и каллусогенеза ячменя является соотношение гормонов 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,4-0,6 мг/л БАП, а также концентрация 2,4-Д 2,0 мг/л, взятая в отдельности, без добавления БАП. Существенного влияния трофических факторов на индукцию эмбриоидогенеза и каллусогенеза в культуре изолированных пыльников овса и ячменя не отмечено. Выявлено, что н-бутанол в большей мере, чем фикол стимулирует индукцию эмбриоидогенеза и каллусогенеза в культуре изолированных пыльников. Наиболее высокий выход эмбриоподобных структур и каллусов отмечен у сорта ячменя Асем и овса Донен. Всего получено 57 каллусов и 2 регенеранта ячменя и 63 каллуса овса.

Литература

- 1 Ślusarkiewicz-Jarzina, A., & Ponitka, A. (2007). The effect of physical medium state on anther culture response in polish cultivated oat (*Avena sativa* L.). *Acta Biologica Cracoviensia*, 49(2), 27–31.
- 2 Ponitka, A., & Ślusarkiewicz-Jarzina, A. (2009). Regeneration of oat androgenic plants in relation to induction media and culture conditions of embryo-like structures. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 78(3), 209–213.
- 3 Marcińska, I., Nowakowska, A., Skrzypek, E., & Czyczyło-Mysza, I. (2013). Production of double haploids in oat (*Avena sativa* L.) by pollination with maize (*Zea mays* L.). *Central European Journal of Biology*, 8(3), 306–313. doi:10.2478/s11535-013-0132-2
- 4 Rines, H.W., Riera-Lizarazu, O., Nunez, V.M., Davis, D.W., & Phillips, R.L. (1997). Oat haploids from anther culture and from wide hybridizations. In S. M. Jain, S. K. Sopory, & R. E. Veilleux (Eds.), *In Vitro Haploid Production in Higher Plants* (Vol. 26, pp. 205–221). Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-017-1862-2_11
- 5 Sidhu, P.K., Philip A. Davies, & Davies, P.A. (2009). Regeneration of fertile green

plants from oat isolated microspore culture. *Plant Cell Reports*, 28(4), 571–577. doi:10.1007/s00299-009-0684-4

6 Ferrie, A.M. R., K.I. Irmen, Beattie, A.D., & Rossnagel, B.G. (2014). Isolated microspore culture of oat (*Avena sativa* L.) for the production of doubled haploids: effect of pre-culture and post-culture conditions. *Plant Cell Reports*, 116(1), 89–96. <http://doi.org/10.1007/s11240-013-0385-0>

7 Clapman D. Haploid *Hordeum* plants from anthers *in vitro* // Z. Pflanzenzüchtg. – 1973. - Vol. 69. – P. 142-155.

8 Kao K.N., Saleem M., Abrams S., Pedras M., Horn D., Mallard C. Culture conditions for induction of green plants from barley microspores by anther culture methods // *Plant Cell Reports*. – 1991. - Vol. 9. – P. 595-601.

9 Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15. – 473-497.

10 Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. Москва: Агропромиздат, 1988. Вып. 4.

11 Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assay with Tobacco cultures // *Physiol Plantarum*. - 1962. - Vol. 15. - P. 473-475.

12 Asakaviciute, R. (2008). Androgenesis in Anther Culture of Lithuanian Spring Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivars. *Turk J. Biol.*, 32, 155–160

Уразалиев К.Р., Даниярова А.К., Сариев Б.С.

СҰЛЫ ЖӘНЕ АРПА ТОЗАН КУЛЬТУРАСЫНДА КАЛЛУС ИНДУКЦИЯСЫ

Аңдатпа

Сұлы және арпа тозан культурасындағы каллусогенез және эмбриодогенез процестеріне генотип әсерінің ерекшеліктері анықталды. Арпа генотиптер арасында – Арна, Әсем, Елік сорттары және сұлы генотиптердің арасында – Донен және Аламан сорттары каллусогенез және эмбриодогенезге қабілеттілігімен ерекшеленді. Оқшауланған тозан культурасында каллусогенез және эмбриогенез процессіне фитогормондардың әсері зерттеу кезінде арпа культурасына ең оңтайлы гормондар 1,0 мг/л 2,4-Д және 0,4-0,6 мг/л БАП қатынасы және БАП қосылмаған 2,0 мг/л 2,4-Д орталары болып табылды. Оқшауланған тозан культурасында н-бутанол және фикоидың каллусогенез және эмбриодогенез процестерін күшейте түсетіні анықталды.

Кілт сөздер: гаплоидтық технология, арпа, сұлы, тозан культурасы, қоректік орта.

Urazaliev K.R., Daniyarova A.K., Sariev B.S.

CALLUS INDUCTION'S IN ISOLATED ANTHER CULTURE OF OAT AND BARLEY

Annotation

The features of genotype influence on callusogenesis and embryogenesis in anther culture of oats and barley have been revealed. Most responsive genotypes among the barley varieties – Arna, Asem, Elika, and oat – varieties Donen and Alaman have been appeared. Study the effect of phytohormones on the induction of callusogenesis and embryogenesis in isolated anthers culture of barley was shown that the ratio of hormones 1,0 mg/l 2,4-D and 0,4-0,6 mg/l BAP or 2,0 mg/l 2,4-D without the addition of BAP is most optimal. The positive influence of n-butanol more than ficoll on the induction of callusogenesis and embryogenesis of isolated anthers culture have been revealed.

Keywords: haploid technology, anther culture, barley, oat, culture medium.